

## Beschreibung

5

Verfahren zur Herstellung von L-Phosphinothricin durch enzymatische Transaminierung mit Aspartat

Die Erfindung betrifft das technische Gebiet der Synthese von Pflanzenschutzmittel-  
10 wirkstoffen, insbesondere die Synthese von L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)  
buttersäure (L-Phosphinothricin, L-PPT) aus 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxo-  
buttersäure (HMPB, PPO) durch enzymatische Transaminierung in Gegenwart von  
Aspartat in Gegenwart einer PPO-spezifischen Aspartat-Transaminase (Asp-TA).  
Die Verbindung L-PPT, deren Salze und einige Derivate davon sind herbizid  
15 wirksame nicht-proteinogene Aminosäuren bzw. Salze und Derivate davon (DE-A-  
2717440). Die jeweilige L-Form ist dabei biologisch aktiv, während die jeweilige D-  
Form praktisch unwirksam ist (DE-A-2856260).

Es ist bereits bekannt, daß sich Transaminasen aufgrund ihrer hohen  
20 Stereoselektivität und einer relativ breiten Substratspezifität besonders für die  
chirale, enzymatische Synthese von Aminosäuren aus ihren korrespondierenden  
Ketosäurevorstufen eignen. Ein Nachteil für den technischen Einsatz von  
Transaminasen ist jedoch ihre Gleichgewichtskonstante von ca. 1, so daß das  
gewünschte Produkt im allgemeinen nur in einer 50 % igen Ausbeute entstehen  
25 kann (US-A-4,826,766). In EP-A-0344683 und in US-A-5,221,737 wird die  
Herstellung des herbiziden Wirkstoffs L-Phosphinothricin [(L-Homoalanin-4-yl-  
(methyl)phosphinsäure, L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-buttersäure, L-  
PPT)], einer nicht-proteinogenen Aminosäure, durch Transaminierung aus der  
korrespondierenden Ketosäure [(2-Oxo-4-((Hydroxy)(Methyl)Phosphinoyl)-  
30 buttersäure, PPO)] mit 4-Aminobutyrat : 2-Ketoglutarat -Transaminase (GABA-  
Transaminase, EC 2.6.1.19) aus *Escherichia coli* beschrieben. Für eine quantitative  
Umsetzung wird ein hoher molarer Überschuß des Aminodonors Glutamat benötigt,  
was die Aufreinigung des Reaktionsproduktes erschwert.

Eine Lösung dieses Problems ist durch die Verwendung von Aspartat als Aminodonor möglich, da die korrespondierende Ketosäure Oxalacetat in wäßrigem Milieu instabil ist und spontan zu Pyruvat decarboxyliert. Durch die Entfernung eines Reaktionsproduktes aus dem Gleichgewicht kann keine Rückreaktion stattfinden und  
5 eine quantitative Umsetzung ist auch bei äquimolarem Einsatz von Ketosäure und Donoraminosäure möglich. Ein solches Verfahren wird z.B. in der EP-A-0135846 beschrieben.

Die Anwendung dieses Prinzips auf die enzymatische Synthese von L-  
10 Phosphinothricin war jedoch bisher nicht möglich, da die beschriebene GABA-Transaminase Aspartat als Aminodonor nicht akzeptiert und auch keine andere Transaminase mit gemeinsamer Spezifität für L-Phosphinothricin und Aspartat bekannt war.

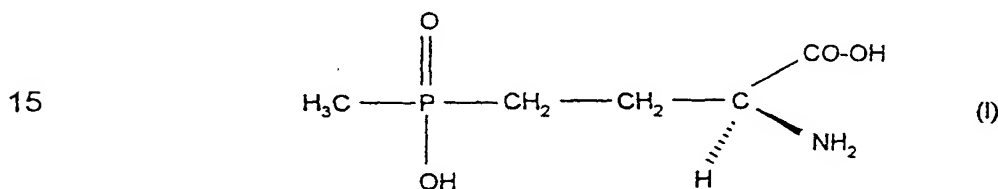
15 Hilfsweise wurde ein gekoppeltes 2-Enzym-System, bestehend aus PPT-spezifischer Transaminase und Glutamat : Oxalacetat - Transaminase (GOT, EC 2.6.1.1) vorgeschlagen (EP-A-0249188 und EP-A-0477902). Bei dieser Reaktionsführung wird das bei der Synthese von L-PPT verbrauchte Glutamat mittels GOT aus Aspartat regeneriert. Die Aspartat-Transaminase selbst hat keine Spezifität für L-  
20 PPT/PPO. Die spontane Umwandlung von Oxalacetat zu Pyruvat führt auch für die Gesamtreaktion zu einer Gleichgewichtsverschiebung in Richtung L-PPT-Synthese. Dabei sind quantitative Produktausbeuten bei äquimolarem Einsatz von PPO und Aspartat und deutlichem Unterschuß von Glutamat möglich.

25 Durch diesen gekoppelten Enzymprozeß kann die Überdosierung der in der Substratlösung vorhandenen Donoraminosäuren gegenüber der Akzeptorketosäure PPO deutlich vermindert werden, was die Aufarbeitung der Produktlösung vereinfacht. Jedoch ist bei der gekoppelten Reaktionsführung weiterhin die Verwendung von Glutamat erforderlich, das - im Gleichgewicht mit Ketoglutarat - im  
30 Reaktionsprodukt verbleibt oder durch aufwendige Reinigungsverfahren von der strukturell sehr ähnlichen Aminosäure L-PPT abgetrennt werden muß. Außerdem ist

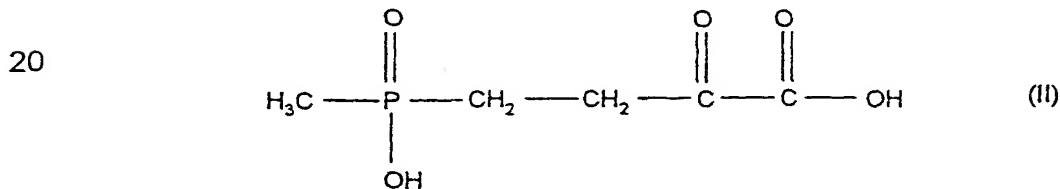
die Optimierung der Reaktionsführung mit 2 Enzymen auf Grund der unterschiedlichen kinetischen Parameter schwieriger als mit einem Enzym.

Obwohl bisher bekannte Aspartat-Transaminasen, wie z.B. GOT keine Umsetzung von PPO zeigen, wurden nun überraschenderweise Aspartat-Transaminasen aus Mikroorganismen gefunden, die ebenfalls L-PPT/PPO mit hoher Spezifität als Substrat akzeptieren. Diese Enzyme katalysieren eine direkte Übertragung der alpha-Aminogruppe des Aspartats auf PPO.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung von L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-buttersäure (L-Phosphinothricin, L-PPT) der Formel (I), deren Derivaten und/oder Salzen,



aus 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxo-buttersäure (HMPB, PPO) der Formel (II),



deren Derivaten und/oder Salzen als Akzeptor durch enzymatische Transaminierung in Gegenwart von Aspartat als Donor, wobei die Transaminierung in Gegenwart einer oder mehrerer akzeptor-spezifischen, vorzugsweise PPO-spezifischen Aspartat-Transaminasen (Asp-TA) zu Oxalacetat und der Verbindung der Formel (I), deren Derivate und/oder Salzen erfolgt, vorzugsweise in Gegenwart von einer oder mehreren thermostabilen und/oder isolierten Aspartat-Transaminase und ganz besonders bevorzugt in Gegenwart von einer oder mehreren Aspartat-Transaminasen mit einer möglichst geringen Substratspezifität für Pyruvat, so daß

die Bildung des Nebenprodukts Alanin reduziert oder weitgehend vermieden werden kann.

Salze von L-PPT sind im allgemeinen Salze mit anorganischen und/oder  
5 organischen Säuren oder Mono- und Disalze mit anorganischen und/oder  
organischen Basen. Salze mit Säuren (Säureadditionssalze) sind beispielsweise  
Salze mit Mineralsäuren, wie Salzsäure (Hydrochlorid) oder Schwefelsäure (Sulfate),  
oder mit Kohlensäure (Carbonate, Hydrogencarbonate) oder mit organischen  
Säuren, wie Essigsäure (Acetate), Ameisensäure (Formiate), Propionsäure  
10 (Propiate) oder Weinsäure (Tartrate). Salze mit Basen sind beispielsweise Alkali-  
und Erdalkalimetallsalze, Ammoniumsalze, Salze mit organischen Aminen, wie  
primären, sekundären oder tertiären Aminen, und quartäre Ammoniumsalze.

Derivate sind beispielsweise Ester von L-PPT, die an der Phosphinsäuregruppe  
15 verestert sind, beispielsweise verestert sind mit C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkanolen wie Methanol,  
Ethanol, n-Propanol, i-Propanol, n-, i- und sec- oder tert-Butanol und C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-  
Cycloalkanolen wie Cyclohexanol. Derivate sind auch Ester von L-PPT die alternativ  
oder zusätzlich an der Carbonsäuregruppe verestert sind, beispielsweise mit den  
bereits vorstehend genannten Alkoholen. Derivate sind auch das Carbonamid von L-  
20 PPT und dessen Derivate, gegebenenfalls N-Alkyl oder N,N-Dialkylamide mit  
vorzugsweise 1 bis 4 C-Atomen im Alkylteil.

Derivate von PPO sind beispielsweise deren Salze mit anorganischen und/oder  
organischen Basen, wobei dafür geeignete Basen bereits im Zusammenhang mit L-  
25 PPT genannt wurden. Derivate sind beispielsweise auch Ester von PPO, die an der  
Carbonsäuregruppe oder der Phosphinsäuregruppe oder beiden verestert sind. Als  
Alkohole für die Estergruppen eignen sich formal die für Ester von L-PPT geeigneten  
Alkohole, vorzugsweise die dort genannten Alkanole. Derivate sind auch das  
Carbonamid von PPO und dessen Derivaten, die an der Phosphinsäuregruppe  
30 verestert sind, sowie gegebenenfalls entsprechende N-Alkyl oder N,N-Dialkylamide.

Aspartat bezeichnet vorzugsweise L-Asparaginsäure oder deren Salze, vorzugsweise Alkalimetallsalze. Als Aspartat kann aber auch L-Asparaginsäure in Mischungen mit D-Asparaginsäure, beispielsweise als racemische D,L-Asparaginsäure eingesetzt werden.

5

Alternativ kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren gegebenenfalls vorhandenes Pyruvat aus der Reaktionsmischung physikalisch, chemisch und/oder enzymatisch entfernt werden, vorzugsweise durch Umsetzung mittels enzymatische Katalyse, z.B. durch Acetolactat-Synthase (ALS), Pyruvat-Decarboxylase, Pyruvat-Oxidase, insbesondere Acetolactat-Synthase; ganz besonders bevorzugt erfolgt die  
10 Umsetzung von Pyruvat in Gegenwart eines relativ thermostabilen Enzyms. Die so verwendeten Enzyme können gegebenenfalls in immobilisierter Form vorliegen.

Beide Substrate (Donor und Akzeptor) werden beispielsweise in einem molaren  
15 Verhältnis von 0,5-2 : 1 (bezogen auf L-Asparaginsäure : PPO) eingesetzt, vorzugsweise 0,75-1,5 : 1, insbesondere etwa äquimolar. Beim Einsatz von Gemischen von L- und D-Asparaginsäuren(salzen) ist die molare Menge von L-Asparaginsäure(salz) maßgebend. PPO-Derivate sind in molaren Mengen entsprechend PPO einzusetzen. Die Anwesenheit von Glutamat in der  
20 Substratlösung ist nicht notwendig. Einige der gefundenen Enzyme weisen eine ausgezeichnete Thermostabilität auf. Die Prozeßführung ist daher in einem weiten Temperaturbereich möglich, beispielsweise bei Temperaturen von 10 bis 95°C, vorzugsweise von 40 bis 90°C, insbesondere von 60 bis 85°C. Bei Enzymen, die keine besondere Thermostabilität aufweisen liegt der bevorzugte Temperaturbereich  
25 bei 20 bis 70°C, insbesondere bei 30 bis 40°C.

Durch die relativ hohen Temperaturen läßt sich die Reaktionsgeschwindigkeit erheblich beschleunigen, was auch die Umsetzung von konzentrierteren Substratlösungen (10 % ig) mit hohen Raum/Zeit-Ausbeuten ermöglicht. Die  
30 Reaktion erfolgt vorzugsweise bei einem pH-Wert im Bereich von 6,5-10, vorzugsweise von 7 bis 9, insbesondere von 7,5 bis 8,5 in einem entsprechend

geeigneten Puffersystem mit einem pKa-Wert im Bereich von 7-9, unter anderem Phosphat- oder Tris-Puffer. Überraschenderweise besitzen die biochemisch näher charakterisierten Enzyme keine Spezifität für GABA und unterscheiden sich somit deutlich von bisher bekannten L-PPT/PPO-spezifischen Transaminasen.

5

Besonders hohe Konversionsraten lassen sich in der Reaktion erreichen, wenn die Entstehung von Alanin während der Transaminierung vermieden bzw. minimiert werden kann. Zu diesem Zweck können gegebenenfalls optimierte ASP-TA-Varianten ohne Substratspezifität für Pyruvat verwendet werden. Alternativ kann

- 10 Pyruvat physikalisch, z. B. durch Verwendung selektiv permeabler Membranen und/oder chemisch bzw. enzymatisch, z. B. durch Umsetzung mit Pyruvat-Decarboxylase, Pyruvat-Oxidase oder Acetolactat-Synthase aus dem Reaktionsansatz entfernt werden (siehe z.B. Taylor et al., TIBTECH (1998) vol. 16, 412-418; Fotheringham et al., CHIMICA OGGI/chemistry today (1997), 9/10, 33-38; 15 WO 98/53088).

Die Reinigung des Produkts, L-PPT, aus der Reaktionslösung kann gegebenenfalls nach bekannten und üblichen Verfahren erfolgen, beispielsweise durch Extraktion mit Methylisobutylketon oder über eine Kationenaustauscherchromatographie, z.B.

- 20 mit Amberlite<sup>®</sup> IR 120 (Hersteller Sigma).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in den folgenden Beispielen weitergehend erläutert und die Erfindung in den Patentansprüchen definiert. Die nachfolgenden Beispiele sind insofern nicht limitierend zu verstehen.

Beispiele:

1.) Isolierung von Bodenmikroorganismen mit L-PPT-spezifischer Aspartat-Transaminase Aktivität:

5

Je 1g verschiedener Bodenproben (Humus, Lehm, Sand/Schwanheimer Düne, Frankfurt) wurden mit 10 ml 10 mM NaPhosphat-Puffer, pH = 7,0 für 1 h bei Raumtemperatur extrahiert. Aus den Extrakten wurden Anreicherungskulturen in folgendem Medium angeimpft:

10

5 mM Glucose

5 mM Succinat

10 mM Glycerin

10 mM PPO

15

10 mM L-Asparaginsäure

50 ml/l Lösung A

25 ml/l Lösung B

Lösung A: 50 g/l  $K_2HPO_4$

20

Lösung B: 2,5 g/l  $MgSO_4$

0,5 g/l NaCl

25 ml/l aus einer Stammlösung  
enthaltend:

1 g/l  $FeSO_4 \times 7 H_2O$

0,22 g/l  $MnSO_4 \times H_2O$

25

0,1 g/l  $H_3BO_3$

0,1 g/l  $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$

0,18 g/l  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$

0,16 g/l  $CuSO_4 \times 5 H_2O$

0,1 g/l  $CoCl_2 \times 6 H_2O$

30

1 ml/l 1 N HCl

Die Kulturen wurden für 3-5 Tage bei 28°C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Aus einer der getesteten Bodenproben (Humus) ließen sich Mikroorganismen anreichern, die mit L-Asparaginsäure als alleiniger N-Quelle wachsen konnten. Die Kultur wurde mehrfach im gleichen Medium weiterpassagiert

5 und dann zur Isolierung von Einzelklonen auf Agar-Medium der gleichen Zusammensetzung ausplattiert. Nach Inkubation für 3-5 Tage bei 28°C wurden insgesamt 100 Einzelkolonien isoliert und wieder in Flüssigmedium angeimpft (siehe oben). Die Vereinzelnung auf Agar-Platten wurde noch 2 x wiederholt, um die Gewinnung von Reinkulturen sicherzustellen.

10 Nach diesen Selektionszyklen waren 20 Einzelstämme vorhanden, die mit L-Asparaginsäure als alleiniger N-Quelle wachsen konnten.

Zum Testen auf PPO/Asp-Transaminase-Aktivität wurden je 2 ml Kulturen der Stämme wie oben angezogen. Anschließend wurden je 400 µl der Kulturen mit 0,5 % Toluol, 0,5 % Ethanol für 30 min. bei 37°C permeabilisiert. Die Zellpellets wurden in je 50 µl Reaktionsmix bestehend aus 50 mM PPO, 50 mM L-Asparaginsäure, 50 mM Tris/HCl, pH = 8,0, 10 µM Pyridoxalphosphat resuspendiert und über Nacht bei 28°C inkubiert.

20 Zur qualitativen Bestimmung des gebildeten PPT wurden die Reaktionsüberstände 1:5 in Wasser verdünnt und davon je 5 µl durch Dünnschichtchromatographie auf HPTLC-Zellulose-Platten (Merck) mit n-Butanol : Eisessig : Wasser = 60 : 15 : 25 als Laufmittel analysiert. Die Aminosäuren wurden durch Ninhydrin-Färbung visualisiert. Bei 4 Stämmen (DSM 13353, DSM 13354, DSM 13355, DSM 13356; alle Stämme wurden bei der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ hinterlegt.) konnte die Bildung von Phosphinothricin nachgewiesen werden. Die Enantiomerenreinheit des Reaktionsproduktes wurde durch chirale HPLC [mit der Trennsäule Chirex® (D) mit Penicillamin als Matrix (Hersteller Phenomenex) untersucht] (Laufmittel: 2 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 % Methanol, Flußrate: 0,5 ml/min., UV-Detektion: 254 nm, Retentionszeiten: L-PPT: ca. 17 min., D-PPT: ca. 21 min.). In

25

30



allen 4 untersuchten Testproben konnte hierdurch L-PPT und kein D-PPT als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

Zur Herstellung von L-PPT durch Biotransformation sowie einer quantitativen

- 5 Analyse des Reaktionsverlaufs wurden je 1l Kulturen der Bodenbakterienstämme DSM 13354, DSM 13355 und DSM 13356 im Medium wie auf S. 7 beschrieben, für 48 Stunden bei 28°C angezogen. Die Zellen wurden durch Abzentrifugieren geerntet, 1x in 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 7,5 gewaschen und anschließend über Nacht lyophilisiert.
  - 10 Zur Durchführung der Biotransformation wurden je 200 mg Zelltrockenmasse der oben bezeichneten Bodenbakterienstämme in 10 ml der folgenden Substratlösung resuspendiert:
    - 100 mM PPO
    - 200 mM L-Asparaginsäure
    - 15 100 mM Tris/HCL, pH = 8,0
    - 1 mM Pyridoxalphosphat
- Die Ansätze wurden auf dem Inkubationsschüttler bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Nach 1, 2, 4, 8, 24 und 30 h wurden je 200 µl Proben entnommen und in der HPLC, wie aus S. 8 beschrieben, analysiert. Die Meßergebnisse für L-PPT und L-
- 20 Asparaginsäure sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Die maximal erzielte Konversionsrate [produziertes L-PPT/PPO im Substrat x 100] lag bei ca. 59% (DSM 13355).

Tabelle 1: Reaktionsverlauf der PPO/Aspartat-Transaminierung durch Biotransformation mit Bodenisolaten

| Stamm     | Reaktionszeit [h]* | L-PPT [mM] | Asparaginsäure [mM] |
|-----------|--------------------|------------|---------------------|
|           |                    |            |                     |
| DSM 13354 | 1                  | 3,9        | 174,0               |
|           | 2                  | 5,7        | 150,0               |
|           | 4                  | 10,3       | 100,0               |
|           | 8                  | 23,8       | 30,3                |
|           | 24                 | 38,3       | 0                   |
|           | 30                 | 48,4       | 0                   |
|           |                    |            |                     |
| DSM 13355 | 1                  | 4,5        | 143,1               |
|           | 2                  | 7,7        | 122,7               |
|           | 4                  | 11,1       | 98,8                |
|           | 8                  | 24,8       | 76,4                |
|           | 24                 | 44,9       | 17,2                |
|           | 30                 | 59,1       | 9,8                 |
|           |                    |            |                     |
| DSM 13356 | 1                  | 5,7        | 138,1               |
|           | 2                  | 8,4        | 124,4               |
|           | 4                  | 12,5       | 95,9                |
|           | 8                  | 27,5       | 58,8                |
|           | 24                 | 51,3       | 14,3                |
|           | 30                 | 49,6       | 7,2                 |

\*: Reaktionstemperatur: 37°C

2.) Nachweis der direkten PPO/Aspartat-Transaminierung mit Transaminase-Enzympräparaten:

Insgesamt 7 verschiedene, kommerziell erhältliche Transaminasen wurden auf PPO/Aspartat-Transaminierung getestet. Aus Mikroorganismen stammende (thermostabile Transaminasen AMN-001-01, -001-02, -001-03, -001-04, -001-05, enthalten in den Aminotransferase-Testkit von Diversa CAT# AMN-001 (1998); Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Sigma). Die Enzympräparate wurden mit einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH = 8,0 gelöst und anschließend über Nacht bei 4°C gegen den gleichen Puffer dialysiert. Dadurch sollten in den Enzympräparationen möglicherweise vorhandene Aminodonoren und -akzeptoren, die als Zwischenüberträger bei der Transaminierung fungieren könnten, entfernt werden. Die Enzymlösungen wurden anschließend auf 1 mg/ml eingestellt und in 50 µl Ansätzen mit Reaktionspuffer bestehend aus 50 mM PPO, 50 mM L-Asparaginsäure, 50 mM Tris/HCl, pH = 8,0, 10 µM Pyridoxalphosphat für 1 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

Die Enzymtests wurden durch Dünnschichtchromatographie und chirale HPLC, wie in Beispiel 1 beschrieben, analysiert. Bei 2 der thermostabilen Enzyme, AMN-001-03 und AMN-001-04 (Reaktionstemperatur: 80°C), konnte die enantioselektive Bildung von L-PPT durch Transaminierung aus L-Asparaginsäure nachgewiesen werden. Alle anderen getesteten Enzyme zeigten keine Reaktivität.

3.) Quantitative Untersuchung der PPO/Aspartat-Transaminierung mit der thermostabilen Transaminase AMN-001-03:

Aufgrund der höheren spezifischen Aktivität wurde die Transaminase AMN-001-03 für die genauere Charakterisierung der L-PPT-Synthese-Reaktion ausgewählt. 1 ml einer Substratlösung bestehend aus 40 mM PPO, 48 mM L-Asparaginsäure, 50 mM Tris/HCl, pH = 8,0, 0,1 mM Pyridoxalphosphat wurden mit 1 mg Transaminase AMN-001-03 bei 80°C inkubiert. Zur Analyse des Reaktionsverlaufs wurden über einen Zeitraum von 24 h je 50 µl Aliquots abgenommen und bei -20°C eingefroren. PPT und Aspartat wurden im Aminosäureanalysator (Biotronic LC 5001) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Unter den gewählten Bedingungen wurde das Reaktionsgleichgewicht der L-PPT-Synthese nach 2-4 h erreicht. Der eingesetzte Aminodonor L-Asparaginsäure war nach 7 h vollständig verbraucht. Es wurde eine Konversionsrate [produziertes L-PPT/PPO im Substrat x 100] von ca. 75 % erzielt.

Tabelle 2: Reaktionsverlauf der PPO/Aspartat-Transaminierung mit Transaminase AMN-001-03

| Reaktionszeit [h]* | L-PPT [mM] | Aspartat [mM] |
|--------------------|------------|---------------|
| 0                  | 0          | 53,4          |
| 1                  | 9,5        | 47,8          |
| 2                  | 20,8       | 33,8          |
| 4                  | 25,7       | 12,5          |
| 7                  | 29,7       | 0             |
| 24                 | 28,1       | 0,4           |

\*: Reaktionstemperatur: 80°C

- 4.) Enzymatische, chirale Synthese von L-PPT aus PPO und Aspartat mit partiell gereinigter thermostabiler Transaminase AMN-001-03:

Für die Syntheseveruche wurde partiell gereinigte Transaminase AMN-001-03 mit einer spezifischen Aktivität von 107 nkat/mg Protein (1 nkat = 1 nmol Aspartat/sec.) eingesetzt. Die Reaktionslösung mit einem Volumen von 1 ml enthielt 552 mM PPO (10 %), 700 mM L-Asparaginsäure, 0,1 mM Pyridoxalphosphat, pH = 8,0, eingestellt mit  $\text{KHCO}_3$  und 11,5 mg Enzym. Der Ansatz wurde bei 80°C inkubiert.

Probenabnahme und Analytik erfolgten wie in Beispiel 3 beschrieben.

10

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. In diesem Versuch war das Reaktionsgleichgewicht bereits nach 1 h erreicht. Der Aminodonor L-Asparaginsäure war nach 4 h nahezu vollständig verbraucht. Die Konversionsrate betrug ca. 52 % und die Raum/Zeit-Ausbeute lag bei 4,5 [g L-PPT/g Biokatalysator/h]. In einem Parallelversuch mit gleicher Substratlösung und Enzymkonzentration aber einer Reaktionstemperatur von 60°C, wurde eine ähnliche Konversionsrate bei allerdings deutlich verminderter Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Die Raum/Zeit-Ausbeute betrug nur 0,95 [g L-PPT/g Biokatalysator/h]. Diese Ergebnisse belegen die große Bedeutung der hohen Temperaturstabilität der Transaminase für die Umsatzrate und eine effektive Reaktionsführung.

20

Die nur mäßige Konversionsrate von 52 % ist hauptsächlich auf die Bildung des Nebenproduktes Alanin durch Transaminierung von Pyruvat zurückzuführen.

Wesentlich höhere Konversionsraten lassen sich erreichen, wenn die Entstehung von Alanin während der Reaktion vermieden wird.

25

Tabelle 3: Herstellung von L-PPT durch Transaminierung mit partiell gereinigter thermostabiler Transaminase AMN-001-03

| Reaktionszeit [h]* | L-PPT [mM] | Aspartat [mM] | Alanin [mM] |
|--------------------|------------|---------------|-------------|
|                    |            |               |             |
| 0                  | 0          | 700,0         | 0           |
| 0,5                | 155,3      | 405,8         | 0           |
| 1                  | 286,4      | 193,1         | 98,7        |
| 2                  | 288,5      | 15,2          | 181,5       |
| 4                  | 284,0      | 1,9           | 284,1       |
| 8                  | 251,9      | 1,3           | 234,5       |

\*: Reaktionstemperatur: 80°C



3. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die akzeptor-spezifischen Aspartat-Transaminasen eine geringe Substratspezifität für Pyruvat aufweisen, so daß die Bildung des Nebenprodukts Alanin möglichst vermieden wird.
- 5 4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß vorhandenes Pyruvat aus der Reaktionsmischung physikalisch, chemisch und/oder enzymatisch entfernt wird.
- 10 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung des Pyruvat in Gegenwart von einer oder mehreren Acetolactat-Synthasen (ALS) zu Acetolactat erfolgt.
- 15 6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung des Pyruvat in Gegenwart einer Pyruvat-Decarboxylase zu Acetaldehyd erfolgt.
- 20 7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung des Pyruvat in Gegenwart einer Pyruvat-Oxidase zu Acetylphosphat erfolgt.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung von Pyruvat in Gegenwart eines thermostabilen Enzyms erfolgt.
- 25 9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere der Transaminasen in immobilisierter Form vorliegen.
- 30 10. Ein Mikroorganismus mit der Hinterlegungsnummer DSM 13353
11. Ein Mikroorganismus mit der Hinterlegungsnummer DSM 13354



12. Ein Mikroorganismus mit der Hinterlegungsnummer DSM 13355
13. Ein Mikroorganismus mit der Hinterlegungsnummer DSM 13356



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatic Application No

P EP 00/02809

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P13/04 C12P1/04 C12N1/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | EP 0 477 902 A (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT (DE); BARTSCH K.; FÜLLING G.; SCHULZ A.)<br>1 April 1992 (1992-04-01)<br>cited in the application<br>page 1 -page 3<br>page 7; example 6<br>---<br>-/-- | 1,3,9                 |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 2000

Date of mailing of the international search report

23/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No

PCT/EP 00/02809

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | BARTSCH K. ET AL.: "Stereospecific production of the herbicide Phosphothricin (Glufosinate): purification of Aspartate Transaminase from <i>Bacillus stearothermophilus</i> , cloning of the corresponding gene, aspC, and application in a coupled transaminase process" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 62, no. 10, October 1996 (1996-10), pages 3794-3799, XP002144376<br>page 3794<br>page 3797 -page 3798<br>----- | 1,9                   |
| A          | EP 0 349 965 A (MEIJI SEIKA KAISHA LTD. (JP); MURAKAMI; ANZAI; KUSAMA; SATOH; NAGAOKA) 10 January 1990 (1990-01-10)<br>page 7; example 2<br>-----   | 1                     |
| A          | EP 0 249 188 A (MEIJI SEIKA KAISHA LTD (JP); TAKANE YOSHIZAWA SAITO OGAWA TAKABE ET AL) 16 December 1987 (1987-12-16)<br>cited in the application<br>page 21; claim 8<br>-----  | 1                     |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No

PCT/JP 00/02809

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0477902                                | A | 01-04-1992          | DE 4030578 A               | 16-04-1992          |
|   |   |                     | DE 59108934 D              | 19-03-1998          |
|   |   |                     | JP 3018261 B               | 13-03-2000          |
|   |   |                     | JP 4248987 A               | 04-09-1992          |
|   |   |                     | KR 190203 B                | 01-06-1999          |
| EP 0349965                                | A | 10-01-1990          | JP 2195889 A               | 02-08-1990          |
| EP 0249188                                | A | 16-12-1987          | AT 111530 T                | 15-09-1994          |
|   |   |                     | AU 599985 B                | 02-08-1990          |
|   |   |                     | AU 7375087 A               | 10-12-1987          |
|   |   |                     | BR 8702886 A               | 01-03-1988          |
|   |   |                     | DE 3750523 D               | 20-10-1994          |
|   |   |                     | DE 3750523 T               | 02-02-1995          |
|   |   |                     | DK 289687 A                | 10-12-1987          |
|   |   |                     | ES 2059324 T               | 16-11-1994          |
|   |   |                     | HU 46698 A                 | 28-11-1988          |
|   |   |                     | IN 165699 A                | 16-12-1989          |
|   |   |                     | JP 2638541 B               | 06-08-1997          |
|   |   |                     | JP 7250694 A               | 03-10-1995          |
|   |   |                     | JP 1027485 A               | 30-01-1989          |
|   |   |                     | JP 2589693 B               | 12-03-1997          |
|   |   |                     | KR 9405654 B               | 22-06-1994          |
|   |   |                     | NZ 220576 A                | 28-05-1990          |
|   |   |                     | SU 1731067 A               | 30-04-1992          |
|   |   |                     | ZA 8704108 A               | 09-12-1987          |



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PO P 00/02809

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12P13/04 C12P1/04 C12N1/20

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A          | EP 0 477 902 A (HOECHST AKTIENGESellschaft<br>(DE); BARTSCH K.; FÜLLING G.; SCHULZ A.)<br>1. April 1992 (1992-04-01)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Seite 1 -Seite 3<br>Seite 7; Beispiel 6<br>---<br>-/-- | 1,3,9              |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. August 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Macchia, G

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|---|--------------------|
| A         | BARTSCH K. ET AL.: "Stereospecific production of the herbicide Phosphothricin (Glufosinate): purification of Aspartate Transaminase from <i>Bacillus stearothermophilus</i> , cloning of the corresponding gene, aspC, and application in a coupled transaminase process" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 62, Nr. 10, Oktober 1996 (1996-10), Seiten 3794-3799, XP002144376<br>Seite 3794<br>Seite 3797 -Seite 3798<br>---- | 1,9                |
| A         | EP 0 349 965 A (MEIJI SEIKA KAISHA LTD. (JP); MURAKAMI; ANZAI; KUSAMA; SATOH; NAGAOKA) 10. Januar 1990 (1990-01-10)<br>Seite 7; Beispiel 2<br>----  | 1                  |
| A         | EP 0 249 188 A (MEIJI SEIKA KAISHA LTD (JP); TAKANE YOSHIZAWA SAITO OGAWA TAKABE ET AL) 16. Dezember 1987 (1987-12-16)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Seite 21; Anspruch 8<br>-----   | 1                  |



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/JP 00/02809

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP 0477902 A                                       | 01-04-1992                    | DE 4030578 A                      | 16-04-1992                    |
|  |                               | DE 59108934 D                     | 19-03-1998                    |
|  |                               | JP 3018261 B                      | 13-03-2000                    |
|  |                               | JP 4248987 A                      | 04-09-1992                    |
|  |                               | KR 190203 B                       | 01-06-1999                    |
| EP 0349965 A                                       | 10-01-1990                    | JP 2195889 A                      | 02-08-1990                    |
| EP 0249188 A                                       | 16-12-1987                    | AT 111530 T                       | 15-09-1994                    |
|  |                               | AU 599985 B                       | 02-08-1990                    |
|  |                               | AU 7375087 A                      | 10-12-1987                    |
|  |                               | BR 8702886 A                      | 01-03-1988                    |
|  |                               | DE 3750523 D                      | 20-10-1994                    |
|  |                               | DE 3750523 T                      | 02-02-1995                    |
|  |                               | DK 289687 A                       | 10-12-1987                    |
|  |                               | ES 2059324 T                      | 16-11-1994                    |
|  |                               | HU 46698 A                        | 28-11-1988                    |
|  |                               | IN 165699 A                       | 16-12-1989                    |
|  |                               | JP 2638541 B                      | 06-08-1997                    |
|  |                               | JP 7250694 A                      | 03-10-1995                    |
|  |                               | JP 1027485 A                      | 30-01-1989                    |
|  |                               | JP 2589693 B                      | 12-03-1997                    |
|  |                               | KR 9405654 B                      | 22-06-1994                    |
|  |                               | NZ 220576 A                       | 28-05-1990                    |
|  |                               | SU 1731067 A                      | 30-04-1992                    |
|  |                               | ZA 8704108 A                      | 09-12-1987                    |



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|   |           |   |
|---|-----------|---|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b><br><b>C12P 13/04, 1/04, C12N 1/20</b>  | <b>A1</b> | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 00/66760</b><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 9. November 2000 (09.11.00)   |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP00/02809<br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 30. März 2000 (30.03.00)<br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>199 19 848,9 30. April 1999 (30.04.99) DE<br><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> AVEN-<br>TIS CROPS SCIENCE GMBH [DE/DE]; Brüningsstrasse 50,<br>D-65929 Frankfurt (DE).<br><b>(72) Erfinder; und</b><br><b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BARTSCH, Klaus [DE/DE];<br>Im Kleinfeld 54, D-61462 Königstein (DE).   |           | <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB,<br>BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD,<br>GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,<br>LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL,<br>RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN,<br>YU, ZA, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL,<br>SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG,<br>KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH,<br>CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,<br>PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,<br>GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br><br><b>Veröffentlicht</b><br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> |
| <b>(54) Title:</b> METHOD FOR PRODUCING L-PHOSPHINOTHRICINE BY ENZYMATIC TRANSAMINATION WITH ASPARTATE<br><b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON L-PHOSPHINOTHRICIN DURCH ENZYMATISCHE<br>TRANSAMINIERUNG MIT ASPARTAT<br><b>(57) Abstract</b><br><p>The patent application describes a method for the enzymatic, chiral synthesis of L-phosphinothricine by means of transamination from a corresponding keto acid PPO with aspartate as aminodonor. Quantitative conversion can be obtained by means of suitable reaction engineering using approximately equimolar amounts of aminodonor and aminoacceptor, whereby the donoramino acid aspartate is completely used. The use of thermostable transaminases enables high reaction velocity and correspondingly high room/time efficiencies.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b><br><p>Die Patentanmeldung beschreibt ein Verfahren zur enzymatischen, chiralen Synthese von L-Phosphinothricin durch Transaminierung aus seiner korrespondierenden Ketosäure PPO mit Aspartat als Aminodonor. Durch geeignete Reaktionsführung kann eine quantitative Umsetzung bei Einsatz annähernd äquimolarer Mengen von Aminodonor und -akzeptor unter vollständigem Verbrauch der Donoraminosäure Aspartat erreicht werden. Die Verwendung thermostabiler Transaminasen ermöglicht eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit und entsprechend grosse Raum/Zeit-Ausbeuten.</p> |           |   |

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                      |    |  |    |                                   |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|-----------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                              | LS | Lesotho  | SI | Slowenien                         |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                             | LT | Litauen  | SK | Slowakei                          |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                           | LU | Luxemburg  | SN | Senegal                           |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                                | LV | Lettland   | SZ | Swasiland                         |
| AZ | Aserbaidshan                 | GB | Vereinigtes Königreich               | MC | Monaco   | TD | Tschad                            |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                             | MD | Republik Moldau                                    | TG | Togo                              |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                                | MG | Madagaskar   | TJ | Tadschikistan                     |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                               | MK | Die ehemalige jugoslawische<br>Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                      |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                         |    |  | TR | Türkei                            |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                               | ML | Mali   | TT | Trinidad und Tobago               |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                               | MN | Mongolei   | UA | Ukraine                           |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                               | MR | Mauretanien  | UG | Uganda                            |
| BY | Belarus                      | IS | Island                               | MW | Malawi   | US | Vereinigte Staaten von<br>Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                              | MX | Mexiko   |    |                                   |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                                | NE | Niger  | UZ | Usbekistan                        |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                                | NL | Niederlande  | VN | Vietnam                           |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                          | NO | Norwegen   | YU | Jugoslawien                       |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik<br>Korea | NZ | Neuseeland   | ZW | Zimbabwe                          |
| CM | Kamerun                      |    |                                      | PL | Polen  |    |                                   |
| CN | China                        | KR | Republik Korea                       | PT | Portugal   |    |                                   |
| CU | Kuba                         | KZ | Kasachstan                           | RO | Rumänien   |    |                                   |
| CZ | Tschechische Republik        | LC | St. Lucia                            | RU | Russische Föderation                               |    |                                   |
| DE | Deutschland                  | LI | Liechtenstein                        | SD | Sudan  |    |                                   |
| DK | Dänemark                     | LK | Sri Lanka                            | SE | Schweden   |    |                                   |
| EE | Estland                      | LR | Liberia                              | SG | Singapur   |    |                                   |

## Beschreibung

5

Verfahren zur Herstellung von L-Phosphinothricin durch enzymatische Transaminierung mit Aspartat

Die Erfindung betrifft das technische Gebiet der Synthese von Pflanzenschutzmittel-  
10 wirkstoffen, insbesondere die Synthese von L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-  
buttersäure (L-Phosphinothricin, L-PPT) aus 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxo-  
buttersäure (HMPB, PPO) durch enzymatische Transaminierung in Gegenwart von  
Aspartat in Gegenwart einer PPO-spezifischen Aspartat-Transaminase (Asp-TA).  
Die Verbindung L-PPT, deren Salze und einige Derivate davon sind herbizid  
15 wirksame nicht-proteinogene Aminosäuren bzw. Salze und Derivate davon (DE-A-  
2717440). Die jeweilige L-Form ist dabei biologisch aktiv, während die jeweilige D-  
Form praktisch unwirksam ist (DE-A-2856260).

Es ist bereits bekannt, daß sich Transaminasen aufgrund ihrer hohen  
20 Stereoselektivität und einer relativ breiten Substratspezifität besonders für die  
chirale, enzymatische Synthese von Aminosäuren aus ihren korrespondierenden  
Ketosäurevorstufen eignen. Ein Nachteil für den technischen Einsatz von  
Transaminasen ist jedoch ihre Gleichgewichtskonstante von ca. 1, so daß das  
gewünschte Produkt im allgemeinen nur in einer 50 % igen Ausbeute entstehen  
25 kann (US-A-4,826,766). In EP-A-0344683 und in US-A-5,221,737 wird die  
Herstellung des herbiziden Wirkstoffs L-Phosphinothricin [(L-Homoalanin-4-yl-  
(methyl)phosphinsäure, L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-buttersäure, L-  
PPT)], einer nicht-proteinogenen Aminosäure, durch Transaminierung aus der  
korrespondierenden Ketosäure [(2-Oxo-4-((Hydroxy)(Methyl)Phosphinoyl)-  
30 buttersäure, PPO)] mit 4-Aminobutyrat : 2-Ketoglutarat -Transaminase (GABA-  
Transaminase, EC 2.6.1.19) aus *Escherichia coli* beschrieben. Für eine quantitative  
Umsetzung wird ein hoher molarer Überschuß des Aminodonors Glutamat benötigt,  
was die Aufreinigung des Reaktionsproduktes erschwert.

Eine Lösung dieses Problems ist durch die Verwendung von Aspartat als Aminodonor möglich, da die korrespondierende Ketosäure Oxalacetat in wäßrigem Milieu instabil ist und spontan zu Pyruvat decarboxyliert. Durch die Entfernung eines Reaktionsproduktes aus dem Gleichgewicht kann keine Rückreaktion stattfinden und eine quantitative Umsetzung ist auch bei äquimolarem Einsatz von Ketosäure und Donoraminosäure möglich. Ein solches Verfahren wird z.B. in der EP-A-0135846 beschrieben.

Die Anwendung dieses Prinzips auf die enzymatische Synthese von L-Phosphinothricin war jedoch bisher nicht möglich, da die beschriebene GABA-Transaminase Aspartat als Aminodonor nicht akzeptiert und auch keine andere Transaminase mit gemeinsamer Spezifität für L-Phosphinothricin und Aspartat bekannt war.

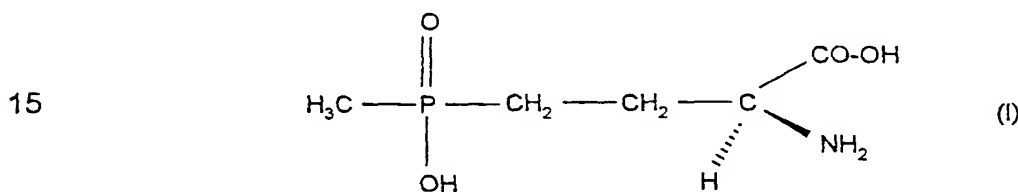
Hilfsweise wurde ein gekoppeltes 2-Enzym-System, bestehend aus PPT-spezifischer Transaminase und Glutamat : Oxalacetat - Transaminase (GOT, EC 2.6.1.1) vorgeschlagen (EP-A-0249188 und EP-A-0477902). Bei dieser Reaktionsführung wird das bei der Synthese von L-PPT verbrauchte Glutamat mittels GOT aus Aspartat regeneriert. Die Aspartat-Transaminase selbst hat keine Spezifität für L-PPT/PPO. Die spontane Umwandlung von Oxalacetat zu Pyruvat führt auch für die Gesamtreaktion zu einer Gleichgewichtsverschiebung in Richtung L-PPT-Synthese. Dabei sind quantitative Produktausbeuten bei äquimolarem Einsatz von PPO und Aspartat und deutlichem Unterschuß von Glutamat möglich.

Durch diesen gekoppelten Enzymprozeß kann die Überdosierung der in der Substratlösung vorhandenen Donoraminosäuren gegenüber der Akzeptorketosäure PPO deutlich vermindert werden, was die Aufarbeitung der Produktlösung vereinfacht. Jedoch ist bei der gekoppelten Reaktionsführung weiterhin die Verwendung von Glutamat erforderlich, das - im Gleichgewicht mit Ketoglutarat - im Reaktionsprodukt verbleibt oder durch aufwendige Reinigungsverfahren von der strukturell sehr ähnlichen Aminosäure L-PPT abgetrennt werden muß. Außerdem ist

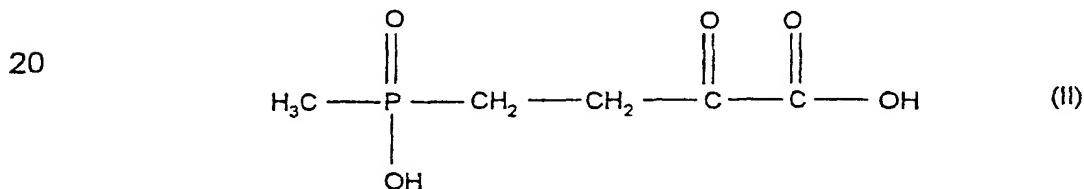
die Optimierung der Reaktionsführung mit 2 Enzymen auf Grund der unterschiedlichen kinetischen Parameter schwieriger als mit einem Enzym.

Obwohl bisher bekannte Aspartat-Transaminasen, wie z.B. GOT keine Umsetzung von PPO zeigen, wurden nun überraschenderweise Aspartat-Transaminasen aus Mikroorganismen gefunden, die ebenfalls L-PPT/PPO mit hoher Spezifität als Substrat akzeptieren. Diese Enzyme katalysieren eine direkte Übertragung der alpha-Aminogruppe des Aspartats auf PPO.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung von L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-buttersäure (L-Phosphinothricin, L-PPT) der Formel (I), deren Derivaten und/oder Salzen,



aus 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxo-buttersäure (HMPB, PPO) der Formel (II),



deren Derivaten und/oder Salzen als Akzeptor durch enzymatische Transaminierung in Gegenwart von Aspartat als Donor, wobei die Transaminierung in Gegenwart einer oder mehrerer akzeptor-spezifischen, vorzugsweise PPO-spezifischen Aspartat-Transaminasen (Asp-TA) zu Oxalacetat und der Verbindung der Formel (I), deren Derivate und/oder Salzen erfolgt, vorzugsweise in Gegenwart von einer oder mehreren thermostabilen und/oder isolierten Aspartat-Transaminase und ganz besonders bevorzugt in Gegenwart von einer oder mehreren Aspartat-Transaminasen mit einer möglichst geringen Substratspezifität für Pyruvat, so daß

die Bildung des Nebenprodukts Alanin reduziert oder weitgehend vermieden werden kann.

Salze von L-PPT sind im allgemeinen Salze mit anorganischen und/oder organischen Säuren oder Mono- und Disalze mit anorganischen und/oder organischen Basen. Salze mit Säuren (Säureadditionssalze) sind beispielsweise Salze mit Mineralsäuren, wie Salzsäure (Hydrochlorid) oder Schwefelsäure (Sulfate), oder mit Kohlensäure (Carbonate, Hydrogencarbonate) oder mit organischen Säuren, wie Essigsäure (Acetate), Ameisensäure (Formiate), Propionsäure (Propiate) oder Weinsäure (Tartrate). Salze mit Basen sind beispielsweise Alkali- und Erdalkalimetallsalze, Ammoniumsalze, Salze mit organischen Aminen, wie primären, sekundären oder tertiären Aminen, und quartäre Ammoniumsalze.

Derivate sind beispielsweise Ester von L-PPT, die an der Phosphinsäuregruppe verestert sind, beispielsweise verestert sind mit C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkanolen wie Methanol, Ethanol, n-Propanol, i-Propanol, n-, i- und sec- oder tert-Butanol und C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Cycloalkanolen wie Cyclohexanol. Derivate sind auch Ester von L-PPT die alternativ oder zusätzlich an der Carbonsäuregruppe verestert sind, beispielsweise mit den bereits vorstehend genannten Alkoholen. Derivate sind auch das Carbonamid von L-PPT und dessen Derivate, gegebenenfalls N-Alkyl oder N,N-Dialkylamide mit vorzugsweise 1 bis 4 C-Atomen im Alkylteil.

Derivate von PPO sind beispielsweise deren Salze mit anorganischen und/oder organischen Basen, wobei dafür geeignete Basen bereits im Zusammenhang mit L-PPT genannt wurden. Derivate sind beispielsweise auch Ester von PPO, die an der Carbonsäuregruppe oder der Phosphinsäuregruppe oder beiden verestert sind. Als Alkohole für die Estergruppen eignen sich formal die für Ester von L-PPT geeigneten Alkohole, vorzugsweise die dort genannten Alkanole. Derivate sind auch das Carbonamid von PPO und dessen Derivaten, die an der Phosphinsäuregruppe verestert sind, sowie gegebenenfalls entsprechende N-Alkyl oder N,N-Dialkylamide.



Aspartat bezeichnet vorzugsweise L-Asparginsäure oder deren Salze, vorzugsweise Alkalimetallsalze. Als Aspartat kann aber auch L-Asparaginsäure in Mischungen mit D-Asparaginsäure, beispielsweise als racemische D,L-Asparaginsäure eingesetzt werden.

5

Alternativ kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren gegebenenfalls vorhandenes Pyruvat aus der Reaktionsmischung physikalisch, chemisch und/oder enzymatisch entfernt werden, vorzugsweise durch Umsetzung mittels enzymatische Katalyse, z.B. durch Acetolactat-Synthase (ALS), Pyruvat-Decarboxylase, Pyruvat-Oxidase, insbesondere Acetolactat-Synthase; ganz besonders bevorzugt erfolgt die Umsetzung von Pyruvat in Gegenwart eines relativ thermostabilen Enzyms. Die so verwendeten Enzyme können gegebenenfalls in immobilisierter Form vorliegen.

10

Beide Substrate (Donor und Akzeptor) werden beispielsweise in einem molaren Verhältnis von 0,5-2 : 1 (bezogen auf L-Asparaginsäure : PPO) eingesetzt, vorzugsweise 0,75-1,5 : 1, insbesondere etwa äquimolar. Beim Einsatz von Gemischen von L- und D-Asparaginsäuren(salzen) ist die molare Menge von L-Asparaginsäure(salz) maßgebend. PPO-Derivate sind in molaren Mengen entsprechend PPO einzusetzen. Die Anwesenheit von Glutamat in der Substratlösung ist nicht notwendig. Einige der gefundenen Enzyme weisen eine ausgezeichnete Thermostabilität auf. Die Prozeßführung ist daher in einem weiten Temperaturbereich möglich, beispielsweise bei Temperaturen von 10 bis 95°C, vorzugsweise von 40 bis 90°C, insbesondere von 60 bis 85°C. Bei Enzymen, die keine besondere Thermostabilität aufweisen liegt der bevorzugte Temperaturbereich bei 20 bis 70°C, insbesondere bei 30 bis 40°C.

20

25

Durch die relativ hohen Temperaturen läßt sich die Reaktionsgeschwindigkeit erheblich beschleunigen, was auch die Umsetzung von konzentrierteren Substratlösungen (10 % ig) mit hohen Raum/Zeit-Ausbeuten ermöglicht. Die Reaktion erfolgt vorzugsweise bei einem pH-Wert im Bereich von 6,5-10, vorzugsweise von 7 bis 9, insbesondere von 7,5 bis 8,5 in einem entsprechend

30

geeigneten Puffersystem mit einem pKa-Wert im Bereich von 7-9, unter anderem Phosphat- oder Tris-Puffer. Überraschenderweise besitzen die biochemisch näher charakterisierten Enzyme keine Spezifität für GABA und unterscheiden sich somit deutlich von bisher bekannten L-PPT/PPO-spezifischen Transaminasen.

5

Besonders hohe Konversionsraten lassen sich in der Reaktion erreichen, wenn die Entstehung von Alanin während der Transaminierung vermieden bzw. minimiert werden kann. Zu diesem Zweck können gegebenenfalls optimierte ASP-TA-Varianten ohne Substratspezifität für Pyruvat verwendet werden. Alternativ kann

10 Pyruvat physikalisch, z. B. durch Verwendung selektiv permeabler Membranen und/oder chemisch bzw. enzymatisch, z. B. durch Umsetzung mit Pyruvat-Decarboxylase, Pyruvat-Oxidase oder Acetolactat-Synthase aus dem Reaktionsansatz entfernt werden (siehe z.B. Taylor et al., TIBTECH (1998) vol. 16, 412-418; Fotheringham et al., CHIMICA OGGI/chemistry today (1997), 9/10, 33-38;  
15 WO 98/53088).

Die Reinigung des Produkts, L-PPT, aus der Reaktionslösung kann gegebenenfalls nach bekannten und üblichen Verfahren erfolgen, beispielsweise durch Extraktion mit Methylisobutylketon oder über eine Kationenaustauscherchromatographie, z.B.

20 mit Amberlite<sup>®</sup> IR 120 (Hersteller Sigma).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in den folgenden Beispielen weitergehend erläutert und die Erfindung in den Patentansprüchen definiert. Die nachfolgenden Beispiele sind insofern nicht limitierend zu verstehen.

Beispiele:

- 1.) Isolierung von Bodenmikroorganismen mit L-PPT-spezifischer Aspartat-Transaminase Aktivität:

5

Je 1g verschiedener Bodenproben (Humus, Lehm, Sand/Schwanheimer Düne, Frankfurt) wurden mit 10 ml 10 mM NaPhosphat-Puffer, pH = 7,0 für 1 h bei Raumtemperatur extrahiert. Aus den Extrakten wurden Anreicherungskulturen in folgendem Medium angeimpft:

10

5 mM Glucose

5 mM Succinat

10 mM Glycerin

10 mM PPO

15 10 mM L-Asparaginsäure

50 ml/l Lösung A

25 ml/l Lösung B

Lösung A: 50 g/l  $K_2HPO_4$

20 Lösung B: 2,5 g/l  $MgSO_4$

0,5 g/l NaCl

25 ml/l aus einer Stammlösung  
enthaltend:

1 g/l  $FeSO_4 \times 7 H_2O$

0,22 g/l  $MnSO_4 \times H_2O$

25

0,1 g/l  $H_3BO_3$

0,1 g/l  $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$

0,18 g/l  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$

0,16 g/l  $CuSO_4 \times 5 H_2O$

0,1 g/l  $CoCl_2 \times 6 H_2O$

30

1 ml/l 1 N HCl

Die Kulturen wurden für 3-5 Tage bei 28°C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Aus einer der getesteten Bodenproben (Humus) ließen sich Mikroorganismen anreichern, die mit L-Asparaginsäure als alleiniger N-Quelle wachsen konnten. Die Kultur wurde mehrfach im gleichen Medium weiterpassagiert und dann zur Isolierung von Einzelklonen auf Agar-Medium der gleichen Zusammensetzung ausplattiert. Nach Inkubation für 3-5 Tage bei 28°C wurden insgesamt 100 Einzelkolonien isoliert und wieder in Flüssigmedium angeimpft (siehe oben). Die Vereinzelnung auf Agar-Platten wurde noch 2 x wiederholt, um die Gewinnung von Reinkulturen sicherzustellen.

- 10 Nach diesen Selektionszyklen waren 20 Einzelstämme vorhanden, die mit L-Asparaginsäure als alleiniger N-Quelle wachsen konnten.

Zum Testen auf PPO/Asp-Transaminase-Aktivität wurden je 2 ml Kulturen der Stämme wie oben angezogen. Anschließend wurden je 400 µl der Kulturen mit 0,5 % Toluol, 0,5 % Ethanol für 30 min. bei 37°C permeabilisiert. Die Zellpellets wurden in je 50 µl Reaktionsmix bestehend aus 50 mM PPO, 50 mM L-Asparaginsäure, 50 mM Tris/HCl, pH = 8,0, 10 µM Pyridoxalphosphat resuspendiert und über Nacht bei 28°C inkubiert.

- 20 Zur qualitativen Bestimmung des gebildeten PPT wurden die Reaktionsüberstände 1:5 in Wasser verdünnt und davon je 5 µl durch Dünnschichtchromatographie auf HPTLC-Zellulose-Platten (Merck) mit n-Butanol : Eisessig : Wasser = 60 : 15 : 25 als Laufmittel analysiert. Die Aminosäuren wurden durch Ninhydrin-Färbung visualisiert. Bei 4 Stämmen (DSM 13353, DSM 13354, DSM 13355, DSM 13356; alle Stämme wurden bei der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ hinterlegt.) konnte die Bildung von Phosphinothricin nachgewiesen werden. Die Enantiomerenreinheit des Reaktionsproduktes wurde durch chirale HPLC [mit der Trennsäule Chirex<sup>®</sup> (D) mit Penicillamin als Matrix (Hersteller Phenomenex) untersucht] (Laufmittel: 2 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 % Methanol, Flußrate: 0,5 ml/min., UV-Detektion: 254 nm, Retentionszeiten: L-PPT: ca. 17 min., D-PPT: ca. 21 min.). In
- 30

allen 4 untersuchten Testproben konnte hierdurch L-PPT und kein D-PPT als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

Zur Herstellung von L-PPT durch Biotransformation sowie einer quantitativen

- 5 Analyse des Reaktionsverlaufs wurden je 1l Kulturen der Bodenbakterienstämme DSM 13354, DSM 13355 und DSM 13356 im Medium wie auf S. 7 beschrieben, für 48 Stunden bei 28°C angezogen. Die Zellen wurden durch Abzentrifugieren geerntet, 1x in 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 7,5 gewaschen und anschließend über Nacht lyophilisiert.

- 10 Zur Durchführung der Biotransformation wurden je 200 mg Zelltrockenmasse der oben bezeichneten Bodenbakterienstämme in 10 ml der folgenden Substratlösung resuspendiert:

100 mM PPO

200 mM L-Asparaginsäure

- 15 100 mM Tris/HCL, pH = 8,0

1 mM Pyridoxalphosphat

Die Ansätze wurden auf dem Inkubationsschüttler bei 200 rpm und 37°C inkubiert.

Nach 1, 2, 4, 8, 24 und 30 h wurden je 200 µl Proben entnommen und in der HPLC, wie aus S. 8 beschrieben, analysiert. Die Meßergebnisse für L-PPT und L-

- 20 Asparaginsäure sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Die maximal erzielte Konversionsrate [produziertes L-PPT/PPO im Substrat x 100] lag bei ca. 59% (DSM 13355).

Tabelle 1: Reaktionsverlauf der PPO/Aspartat-Transaminierung durch Biotransformation mit Bodenisolaten

| Stamm     | Reaktionszeit [h]* | L-PPT [mM] | Asparaginsäure [mM] |
|-----------|--------------------|------------|---------------------|
|           |                    |            |                     |
| DSM 13354 | 1                  | 3,9        | 174,0               |
|           | 2                  | 5,7        | 150,0               |
|           | 4                  | 10,3       | 100,0               |
|           | 8                  | 23,8       | 30,3                |
|           | 24                 | 38,3       | 0                   |
|           | 30                 | 48,4       | 0                   |
|           |                    |            |                     |
| DSM 13355 | 1                  | 4,5        | 143,1               |
|           | 2                  | 7,7        | 122,7               |
|           | 4                  | 11,1       | 98,8                |
|           | 8                  | 24,8       | 76,4                |
|           | 24                 | 44,9       | 17,2                |
|           | 30                 | 59,1       | 9,8                 |
|           |                    |            |                     |
| DSM 13356 | 1                  | 5,7        | 138,1               |
|           | 2                  | 8,4        | 124,4               |
|           | 4                  | 12,5       | 95,9                |
|           | 8                  | 27,5       | 58,8                |
|           | 24                 | 51,3       | 14,3                |
|           | 30                 | 49,6       | 7,2                 |

\*: Reaktionstemperatur: 37°C

2.) Nachweis der direkten PPO/Aspartat-Transaminierung mit Transaminase-Enzympräparaten:

Insgesamt 7 verschiedene, kommerziell erhältliche Transaminasen wurden auf PPO/Aspartat-Transaminierung getestet. Aus Mikroorganismen stammende (thermostabile Transaminasen AMN-001-01, -001-02, -001-03, -001-04, -001-05, enthalten in den Aminotransferase-Testkit von Diversa CAT# AMN-001 (1998); Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Sigma). Die Enzympräparate wurden mit einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH = 8,0 gelöst und anschließend über Nacht bei 4°C gegen den gleichen Puffer dialysiert. Dadurch sollten in den Enzympräparationen möglicherweise vorhandene Aminodonoren und -akzeptoren, die als Zwischenüberträger bei der Transaminierung fungieren könnten, entfernt werden. Die Enzymlösungen wurden anschließend auf 1 mg/ml eingestellt und in 50 µl Ansätzen mit Reaktionspuffer bestehend aus 50 mM PPO, 50 mM L-Asparaginsäure, 50 mM Tris/HCl, pH = 8,0, 10 µM Pyridoxalphosphat für 1 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

Die Enzymtests wurden durch Dünnschichtchromatographie und chirale HPLC, wie in Beispiel 1 beschrieben, analysiert. Bei 2 der thermostabilen Enzyme, AMN-001-03 und AMN-001-04 (Reaktionstemperatur: 80°C), konnte die enantioselektive Bildung von L-PPT durch Transaminierung aus L-Asparaginsäure nachgewiesen werden. Alle anderen getesteten Enzyme zeigten keine Reaktivität.

3.) Quantitative Untersuchung der PPO/Aspartat-Transaminierung mit der thermostabilen Transaminase AMN-001-03:

Aufgrund der höheren spezifischen Aktivität wurde die Transaminase AMN-001-03 für die genauere Charakterisierung der L-PPT-Synthese-Reaktion ausgewählt. 1 ml einer Substratlösung bestehend aus 40 mM PPO, 48 mM L-Asparaginsäure, 50 mM Tris/HCl, pH = 8,0, 0,1 mM Pyridoxalphosphat wurden mit 1 mg Transaminase AMN-001-03 bei 80°C inkubiert. Zur Analyse des Reaktionsverlaufs wurden über einen Zeitraum von 24 h je 50 µl Aliquots abgenommen und bei -20°C eingefroren. PPT und Aspartat wurden im Aminosäureanalysator (Biotronic LC 5001) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Unter den gewählten Bedingungen wurde das Reaktionsgleichgewicht der L-PPT-Synthese nach 2-4 h erreicht. Der eingesetzte Aminodonor L-Asparaginsäure war nach 7 h vollständig verbraucht. Es wurde eine Konversionsrate [produziertes L-PPT/PPO im Substrat x 100] von ca. 75 % erzielt.

Tabelle 2: Reaktionsverlauf der PPO/Aspartat-Transaminierung mit Transaminase AMN-001-03

| Reaktionszeit [h]* | L-PPT [mM] | Aspartat [mM] |
|--------------------|------------|---------------|
| 0                  | 0          | 53,4          |
| 1                  | 9,5        | 47,8          |
| 2                  | 20,8       | 33,8          |
| 4                  | 25,7       | 12,5          |
| 7                  | 29,7       | 0             |
| 24                 | 28,1       | 0,4           |

20 \*: Reaktionstemperatur: 80°C



- 4.) Enzymatische, chirale Synthese von L-PPT aus PPO und Aspartat mit partiell gereinigter thermostabiler Transaminase AMN-001-03:

Für die Syntheseveruche wurde partiell gereinigte Transaminase AMN-001-03 mit einer spezifischen Aktivität von 107 nkat/mg Protein (1 nkat = 1 nmol Aspartat/sec.) eingesetzt. Die Reaktionslösung mit einem Volumen von 1 ml enthielt 552 mM PPO (10 %), 700 mM L-Asparaginsäure, 0,1 mM Pyridoxalphosphat, pH = 8,0, eingestellt mit  $\text{KHCO}_3$  und 11,5 mg Enzym. Der Ansatz wurde bei 80°C inkubiert. Probenabnahme und Analytik erfolgten wie in Beispiel 3 beschrieben.

10

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. In diesem Versuch war das Reaktionsgleichgewicht bereits nach 1 h erreicht. Der Aminodonor L-Asparaginsäure war nach 4 h nahezu vollständig verbraucht. Die Konversionsrate betrug ca. 52 % und die Raum/Zeit-Ausbeute lag bei 4,5 [g L-PPT/g Biokatalysator/h]. In einem Parallelversuch mit gleicher Substratlösung und Enzymkonzentration aber einer Reaktionstemperatur von 60°C, wurde eine ähnliche Konversionsrate bei allerdings deutlich verminderter Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Die Raum/Zeit-Ausbeute betrug nur 0,95 [g L-PPT/g Biokatalysator/h]. Diese Ergebnisse belegen die große Bedeutung der hohen Temperaturstabilität der Transaminase für die Umsatzrate und eine effektive Reaktionsführung.

20

Die nur mäßige Konversionsrate von 52 % ist hauptsächlich auf die Bildung des Nebenproduktes Alanin durch Transaminierung von Pyruvat zurückzuführen. Wesentlich höhere Konversionsraten lassen sich erreichen, wenn die Entstehung von Alanin während der Reaktion vermieden wird.

25

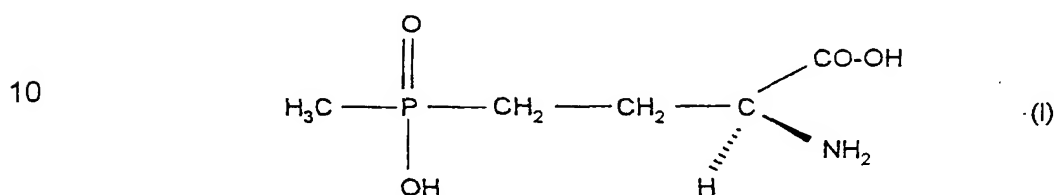
Tabelle 3: Herstellung von L-PPT durch Transaminierung mit partiell gereinigter thermostabiler Transaminase AMN-001-03

| Reaktionszeit [h]* | L-PPT [mM] | Aspartat [mM] | Alanin [mM] |
|--------------------|------------|---------------|-------------|
|                    |            |               |             |
| 0                  | 0          | 700,0         | 0           |
| 0,5                | 155,3      | 405,8         | 0           |
| 1                  | 286,4      | 193,1         | 98,7        |
| 2                  | 288,5      | 15,2          | 181,5       |
| 4                  | 284,0      | 1,9           | 284,1       |
| 8                  | 251,9      | 1,3           | 234,5       |

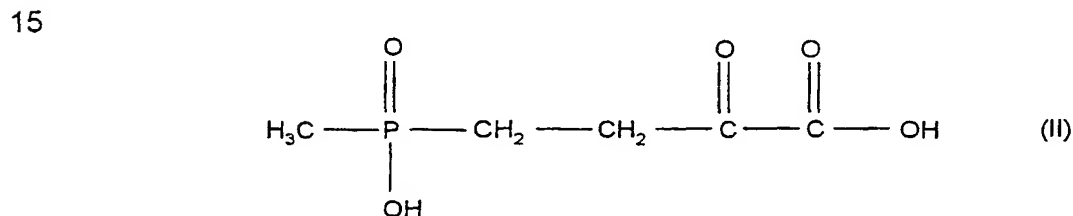
\*: Reaktionstemperatur: 80°C

## Patentansprüche:

- 5 1. Verfahren zur Herstellung von L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-buttersäure (L-Phosphinothricin, L-PPT) der Formel (I), deren Derivaten und/oder Salzen



aus 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxo-buttersäure (HMPB, PPO) der Formel (II),



20 deren Derivaten und/oder Salzen als Akzeptor durch enzymatische Transaminierung in Gegenwart von Aspartat als Donor, wobei die Transaminierung in Gegenwart einer oder mehrerer akzeptor-spezifischen, Aspartat-Transaminasen (Asp-TA) zu Oxalacetat und der Verbindung der Formel (I), deren Derivaten und/oder Salzen erfolgt.

25

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung von Aspartat als Donor und eine Verbindung der Formel II, deren Derivate und/oder Salze als Akzeptor in Gegenwart von einer oder mehreren thermostabilen akzeptor-spezifischen Aspartat-Transaminasen erfolgt.

30

3. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die akzeptor-spezifischen Aspartat-Transaminasen eine geringe Substratspezifität für Pyruvat aufweisen, so daß die Bildung des Nebenprodukts Alanin möglichst vermieden wird.
- 5 4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß vorhandenes Pyruvat aus der Reaktionsmischung physikalisch, chemisch und/oder enzymatisch entfernt wird.
- 10 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung des Pyruvat in Gegenwart von einer oder mehreren Acetolactat-Synthasen (ALS) zu Acetolactat erfolgt.
- 15 6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung des Pyruvat in Gegenwart einer Pyruvat-Decarboxylase zu Acetaldehyd erfolgt.
- 20 7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung des Pyruvat in Gegenwart einer Pyruvat-Oxidase zu Acetylphosphat erfolgt.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung von Pyruvat in Gegenwart eines thermostabilen Enzyms erfolgt.
- 25 9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere der Transaminasen in immobilisierter Form vorliegen.
- 30 10. Ein Mikroorganismus mit der Hinterlegungsnummer DSM 13353
11. Ein Mikroorganismus mit der Hinterlegungsnummer DSM 13354

12. Ein Mikroorganismus mit der Hinterlegungsnummer DSM 13355
13. Ein Mikroorganismus mit der Hinterlegungsnummer DSM 13356



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No  
PCT/ 00/02809

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P13/04 C12P1/04 C12N1/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | EP 0 477 902 A (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT (DE); BARTSCH K.; FÜLLING G.; SCHULZ A.)<br>1 April 1992 (1992-04-01)<br>cited in the application<br>page 1 -page 3<br>page 7; example 6<br>---<br>-/-- | 1,3,9                 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 2000

Date of mailing of the international search report

23/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent Application No.

PCT/EP 00/02809

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | BARTSCH K. ET AL.: "Stereospecific production of the herbicide Phosphothricin (Glufosinate): purification of Aspartate Transaminase from <i>Bacillus stearothermophilus</i> , cloning of the corresponding gene, aspC, and application in a coupled transaminase process" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 62, no. 10, October 1996 (1996-10), pages 3794-3799, XP002144376<br>page 3794<br>page 3797 -page 3798<br>---- | 1,9                   |
| A          | EP 0 349 965 A (MEIJI SEIKA KAISHA LTD. (JP); MURAKAMI; ANZAI; KUSAMA; SATOH; NAGAOKA) 10 January 1990 (1990-01-10)<br>page 7; example 2<br>----   | 1                     |
| A          | EP 0 249 188 A (MEIJI SEIKA KAISHA LTD (JP); TAKANE YOSHIZAWA SAITO OGAWA TAKABE ET AL) 16 December 1987 (1987-12-16)<br>cited in the application<br>page 21; claim 8<br>-----   | 1                     |



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/02809

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0477902                                | A | 01-04-1992          | DE 4030578 A               | 16-04-1992          |
|   |   |                     | DE 59108934 D              | 19-03-1998          |
|   |   |                     | JP 3018261 B               | 13-03-2000          |
|   |   |                     | JP 4248987 A               | 04-09-1992          |
|   |   |                     | KR 190203 B                | 01-06-1999          |
| EP 0349965                                | A | 10-01-1990          | JP 2195889 A               | 02-08-1990          |
| EP 0249188                                | A | 16-12-1987          | AT 111530 T                | 15-09-1994          |
|   |   |                     | AU 599985 B                | 02-08-1990          |
|   |   |                     | AU 7375087 A               | 10-12-1987          |
|   |   |                     | BR 8702886 A               | 01-03-1988          |
|   |   |                     | DE 3750523 D               | 20-10-1994          |
|   |   |                     | DE 3750523 T               | 02-02-1995          |
|   |   |                     | DK 289687 A                | 10-12-1987          |
|   |   |                     | ES 2059324 T               | 16-11-1994          |
|   |   |                     | HU 46698 A                 | 28-11-1988          |
|   |   |                     | IN 165699 A                | 16-12-1989          |
|   |   |                     | JP 2638541 B               | 06-08-1997          |
|   |   |                     | JP 7250694 A               | 03-10-1995          |
|   |   |                     | JP 1027485 A               | 30-01-1989          |
|   |   |                     | JP 2589693 B               | 12-03-1997          |
|   |   |                     | KR 9405654 B               | 22-06-1994          |
|   |   |                     | NZ 220576 A                | 28-05-1990          |
|   |   |                     | SU 1731067 A               | 30-04-1992          |
|   |   |                     | ZA 8704108 A               | 09-12-1987          |



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 7 C12P13/04 C12P1/04 C12N1/20

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A          | EP 0 477 902 A (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT (DE); BARTSCH K.; FÜLLING G.; SCHULZ A.)<br>1. April 1992 (1992-04-01)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Seite 1 -Seite 3<br>Seite 7; Beispiel 6<br>---<br>-/-- | 1,3,9              |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. August 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Macchia, G

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kl. Nr. | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|---------|---|--------------------|
| A       | BARTSCH K. ET AL.: "Stereospecific production of the herbicide Phosphothricin (Glufosinate): purification of Aspartate Transaminase from Bacillus stearothermophilus, cloning of the corresponding gene, aspC, and application in a coupled transaminase process" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 62, Nr. 10, Oktober 1996 (1996-10), Seiten 3794-3799, XP002144376<br>Seite 3794<br>Seite 3797 -Seite 3798<br>---- | 1,9                |
| A       | EP 0 349 965 A (MEIJI SEIKA KAISHA LTD. (JP); MURAKAMI; ANZAI; KUSAMA; SATOH; NAGAOKA) 10. Januar 1990 (1990-01-10)<br>Seite 7; Beispiel 2<br>----  | 1                  |
| A       | EP 0 249 188 A (MEIJI SEIKA KAISHA LTD (JP); TAKANE YOSHIZAWA SAITO OGAWA TAKABE ET AL) 16. Dezember 1987 (1987-12-16)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Seite 21; Anspruch 8<br>-----   | 1                  |

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu einer Patentfamilie gehören

Intern : Aktenzeichen

PCT

00/02809

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP 0477902     A                                   | 01-04-1992                    | DE     4030578 A                  | 16-04-1992                    |
|  |                               | DE     59108934 D                 | 19-03-1998                    |
|  |                               | JP     3018261 B                  | 13-03-2000                    |
|  |                               | JP     4248987 A                  | 04-09-1992                    |
|  |                               | KR     190203 B                   | 01-06-1999                    |
| -----  |                               |                                   |                               |
| EP 0349965     A                                   | 10-01-1990                    | JP     2195889 A                  | 02-08-1990                    |
| -----  |                               |                                   |                               |
| EP 0249188     A                                   | 16-12-1987                    | AT     111530 T                   | 15-09-1994                    |
|  |                               | AU     599985 B                   | 02-08-1990                    |
|  |                               | AU     7375087 A                  | 10-12-1987                    |
|  |                               | BR     8702886 A                  | 01-03-1988                    |
|  |                               | DE     3750523 D                  | 20-10-1994                    |
|  |                               | DE     3750523 T                  | 02-02-1995                    |
|  |                               | DK     289687 A                   | 10-12-1987                    |
|  |                               | ES     2059324 T                  | 16-11-1994                    |
|  |                               | HU     46698 A                    | 28-11-1988                    |
|  |                               | IN     165699 A                   | 16-12-1989                    |
|  |                               | JP     2638541 B                  | 06-08-1997                    |
|  |                               | JP     7250694 A                  | 03-10-1995                    |
|  |                               | JP     1027485 A                  | 30-01-1989                    |
|  |                               | JP     2589693 B                  | 12-03-1997                    |
|  |                               | KR     9405654 B                  | 22-06-1994                    |
|  |                               | NZ     220576 A                   | 28-05-1990                    |
|  |                               | SU     1731067 A                  | 30-04-1992                    |
|  |                               | ZA     8704108 A                  | 09-12-1987                    |
| -----  |                               |                                   |                               |



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 00/02809

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P13/04 C12P1/04 C12N1/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | <p>EP 0 477 902 A (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT (DE); BARTSCH K.; FÜLLING G.; SCHULZ A.)<br/>1 April 1992 (1992-04-01)<br/>cited in the application<br/>page 1 -page 3<br/>page 7; example 6</p> <p style="text-align: center;">---<br/>-/--</p> | 1,3,9                 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 2000

Date of mailing of the international search report

23/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|        |                |
|--------|----------------|
| Patent | Application No |
| EP     | 00/02809       |

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| A  | BARTSCH K. ET AL.: "Stereospecific production of the herbicide Phosphothricin (Glufosinate): purification of Aspartate Transaminase from Bacillus stearothermophilus, cloning of the corresponding gene, aspC, and application in a coupled transaminase process" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 62, no. 10, October 1996 (1996-10), pages 3794-3799, XP002144376<br>page 3794<br>page 3797 -page 3798<br>---- | 1,9                   |
| A  | EP 0 349 965 A (MEIJI SEIKA KAISHA LTD. (JP); MURAKAMI; ANZAI; KUSAMA; SATOH; NAGAOKA) 10 January 1990 (1990-01-10)<br>page 7; example 2<br>----   | 1                     |
| A  | EP 0 249 188 A (MEIJI SEIKA KAISHA LTD (JP); TAKANE YOSHIZAWA SAITO OGAWA TAKABE ET AL) 16 December 1987 (1987-12-16)<br>cited in the application<br>page 21; claim 8<br>-----   | 1                     |



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. App. No.

PCT/EP 00/02809

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0477902 A                              | 01-04-1992          | DE 4030578 A               | 16-04-1992          |
|   |                     | DE 59108934 D              | 19-03-1998          |
|   |                     | JP 3018261 B               | 13-03-2000          |
|   |                     | JP 4248987 A               | 04-09-1992          |
|   |                     | KR 190203 B                | 01-06-1999          |
| EP 0349965 A                              | 10-01-1990          | JP 2195889 A               | 02-08-1990          |
| EP 0249188 A                              | 16-12-1987          | AT 111530 T                | 15-09-1994          |
|   |                     | AU 599985 B                | 02-08-1990          |
|   |                     | AU 7375087 A               | 10-12-1987          |
|   |                     | BR 8702886 A               | 01-03-1988          |
|   |                     | DE 3750523 D               | 20-10-1994          |
|   |                     | DE 3750523 T               | 02-02-1995          |
|   |                     | DK 289687 A                | 10-12-1987          |
|   |                     | ES 2059324 T               | 16-11-1994          |
|   |                     | HU 46698 A                 | 28-11-1988          |
|   |                     | IN 165699 A                | 16-12-1989          |
|   |                     | JP 2638541 B               | 06-08-1997          |
|   |                     | JP 7250694 A               | 03-10-1995          |
|   |                     | JP 1027485 A               | 30-01-1989          |
|   |                     | JP 2589693 B               | 12-03-1997          |
|   |                     | KR 9405654 B               | 22-06-1994          |
|   |                     | NZ 220576 A                | 28-05-1990          |
|   |                     | SU 1731067 A               | 30-04-1992          |
|   |                     | ZA 8704108 A               | 09-12-1987          |

